Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. med. vet. Richard Standfuß



# Ueber die Arbeitsweise bei der Uhlenhuth'schen Eiweißbestimmung

---

## Dissertation

zur

**Erlangung der Doktorwürde**

der

Veterinär-medizinischen Fakultät

der

Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Josef Hollands
Tierarzt
aus Reeserward (Rhld.)

---

Gießen 1937

Buchdruckerei Nitschkowski, Gießen

Aus dem Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. med. vet. Richard Standfuß

# Ueber die Arbeitsweise bei der Uhlenhuth'schen Eiweißbestimmung

## Dissertation

zur

## Erlangung der Doktorwürde

der

Veterinär-medizinischen Fakultät

der

Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Josef Hollands
Tierarzt
aus Reeserward (Rhld.)

Gießen 1937
Buchdruckerei Nitschkowski, Gießen

Gedruckt
mit Genehmigung der Veterinär-medizinischen Fakultät zu Gießen

1. Berichterstatter:
Professor Dr. Standfuß

2. Berichterstatter:
Professor Dr. Jakob

Meiner Mutter

in Dankbarkeit gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis.

## A. Einleitung.

In der Praxis der tierärztlichen Lebensmittelkontrolle kommen häufig Fälle vor, in denen der Verdacht besteht, daß Würste und zubereitete Lebensmittel, für welche nur Fleisch von bestimmten Tieren vorgeschrieben oder zugesichert ist, mit Fleisch von anderen Tierarten vermischt wurden. Die Feststellung solcher Verfälschungen stößt oft auf große Schwierigkeiten. In den meisten Fällen ist der Zusatz – meist Pferdefleisch – fein zerkleinert, sodaß die grobsinnliche Untersuchung, wenn nicht große Mengen zugesetzt wurden, nicht die Art der Verfälschung feststellen kann. Aber auch die mikroskopische und histologische Untersuchung läßt viele Fälle ungeklärt. Ein sicheres und einfaches Verfahren jedoch, die Artzugehörigkeit der Fleischanteile festzustellen, ist die biologische Untersuchung mit Hilfe der Präcipitation nach Uhlenhuth. Dieses in der gerichtlichen Medizin schon seit längerem gebräuchliche und vorgeschriebene Verfahren zur Unterscheidung von Tier- und Menschenblut hat auch in die tierärztliche Fleischbeschau Eingang gefunden und ist im Fleischbeschaugesetz B. B. § 16 für die Auslandsfleischbeschau zur Untersuchung auf Pferdefleisch vorgeschrieben. Auch bei der biologischen Untersuchung auf Milzbrand ist eine dem Präcipitationsverfahren nach Uhlenhuth vergleichbare Schichtprobe von Ascoli eingeführt worden und seit langem im Gebrauch.

Herr Professor Dr. Standfuß stellte mir die Aufgabe zu prüfen, inwieweit die bei der Schichtprobe nach Ascoli eingeführten Arbeitsverfahren auch auf die Uhlenhuth'sche Eiweißbestimmung anwendbar sind.

## B. Schrifttum.

Uhlenhuth (10) schreibt über Begriff und Geschichte der Präcipitation:

Begriff der Präcipitation. Wird einem tierischen Organismus parenteral fremdes Eiweiß einverleibt, so entstehen in dem Organismus Reaktionsprodukte – Präcipitine—, die die Fähigkeit haben, in dem fremden Eiweiß – Präcipitinogen —, in vitro einen Niederschlag – Präcipitat – zu erzeugen.

Das Präcipitinogen kann von Tier und Pflanze stammen. Letzteres wurde zuerst, und zwar bei Bakterieneiweiß entdeckt. Kraus stellte 1897 fest, daß Bakterienfiltrate mit ihrem Immunseris Niederschläge erzeugten. Er erkannte die Spezifität dieser Reaktion bei Cholera-Vibrionen. Nicolle und Marmoreck stellten das Gleiche bei B. Coli und Streptokokken fest. Wladimiroff benutzte die Präcipitation zur Rotzdiagnose, Markl zur Feststellung der Pest. Kraus bestimmte mit Hilfe der Präcipitation artverwandte Mikroorganismen in ausgiebiger Weise. Ascoli und Valenti bauten die Präcipitation für die Milzbranddiagnose aus. Tschistowitsch und Bordet erzeugten Präcipitation mit Pferde- und Aalserum, das Kaninchen eingespritzt wurde. Fish erkannte 1900 die Spezifität des Lactoserums. Uhlenhuth stellte die Eigenart des Eiweißes verschiedener Vogelarten fest, ferner unterschied er Eiweißkörper des Hühnereies und Hühnerblutes. Er beobachtete, daß nur Hühnerblut mit dem spezifischen Serum reagierte, nicht aber andere Blutlösungen. Ausgearbeitet wurde dieses Verfahren zur Unterscheidung der verschiedenen Blutarten für gerichtliche Zwecke. Er bestimmte das Blut, das an zahlreichen Gegenständen aus Kriminalfällen vorhanden war. Heute ist dieses Verfahren in der gerichtlichen Medizin unentbehrlich geworden.

Die Präcipitation ist kein eigentliches Blut-, sondern ein Eiweißdifferenzierungsverfahren. Von Blutserum gewonnene präcipitierende Seren reagieren auch mit Eiter, Sperma, Organsäften, Exsudaten usw. Uhlenhuth stellte fest, daß auch bei jahrealten Organen von Tieren die Reaktionen positiv und spezifisch waren. Auch in alten Räucherwaren und Würsten ist die Herkunft nachweisbar. Gekochtes Fleisch soll nach Uhlenhuth 48 Stunden ausgezogen und dadurch noch vorhandenes Nativeiweiß gelöst werden. Wirklich brauchbare Antisera gegen gekochtes Eiweiß herzustellen, ist bisher nicht gelungen.

Dieses Verfahren der Fleischuntersuchung wurde von Uhlenhuth, Weidanz und Wedemann ausgearbeitet. Für die Auslandsfleischbeschau wurde das Verfahren zum Nachweis von Pferdefleisch durch Bekanntmachung des Reichskanzlers vom 22. 2. 1908 seit dem 1. 4. 08 gesetzlich vorgeschrieben und für die Inlandsfleischbeschau amtlich empfohlen.

Verwandtschaftsreaktion nennt man die Fähigkeit der präcipitierenden Seren, auch in Eiweißlösungen verwandter Tierarten Niederschläge zu erzeugen. So besteht Verwandtschaftsreaktion

zwischen Mensch und Menschenaffen. (Uhlenhuth, Stern, Wassermann, Nuttal). Aehnliche Verwandtschaftsreaktionen bestehen zwischen Esel, Pferd und Tapir; ferner zwischen Hund, Fuchs, Wolf und Schakal; zwischen Hammel, Ziege, Rind und Büffel; zwischen Schwein und Wildschwein u. a. Man kann also auf diese Weise verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Vertretern der einzelnen Tierarten nachweisen. Auch bei Fischen, Reptilien, Amphibien usw., bei Muschelarten und Seidenraupenarten ist die Präcipitation als Unterscheidungsverfahren angewendet worden.

Die Verwandtschaftsreaktion hängt an der chemischen Struktur des Antigens. Sie läßt sich durch „kreuzweise Immunisierung" teilweise ausschalten. Hühner- und Taubenblut können mit von Kaninchen gewonnenen Antiseris nicht unterschieden werden, wohl aber mit Taubenserum vom Huhn und Hühnerserum von der Taube (Uhlenhuth).

Schadauer gelang auf diese Weise die Unterscheidung von Büffel- und Rindfleisch. Uhlenhuth gelang die Unterscheidung von Menschen- und Affenblut, jedoch nicht von Pferd und Esel, Hammel und Ziege. Auf die Verwandtschaftsreaktionen hat man in der Praxis Rücksicht zu nehmen. Außer dieser Reaktion gibt es noch heterologe Trübungen, wenn die Eiweißlösungen zu konzentriert sind. Uebergreifen präcipitierender Antisera wird gelegentlich außerhalb der Verwandtschaftsreaktionen beobachtet; solche Sera müssen ausgeschaltet werden.

## Organspezifität und Bestimmung chemisch verschiedenartiger Eiweißkörper.

Uhlenhuth stellte mit Hilfe von Dotterantiserum fest, daß sich Dottereiweiß und Eiklareiweiß sicher unterscheiden lassen. Gräß entdeckte die Artspezifität des Eiklar. Uhlenhuth stellte fest, daß Linseneiweiß mit Blutantiserum nicht reagiert. Linsenantiserum präcipitiert nur Linseneiweiß, nicht Blut- oder Organeiweiß. Die Linsen der Säugetiere, Amphibien und Vögel enthalten gleichartige Eiweißsubstanzen, sie reagieren alle mit Linsenantiserum. Sonstige Organbestimmung gelang zwischen Serum und Hämoglobin, ein praktisches Bedürfnis nach ihnen liegt jedoch nicht vor. Bauer fand, daß das Eiweißprodukt der Milchdrüse sich von dem Eiweiß des Blutes unterscheiden läßt.

Schloßmann und Moro unterscheiden Frauenmilchalbumin und Kuhmilchalbumin. Das Casein ist artspezifisch. Blutantisera rufen in eiweißhaltigem Harn Trübungen hervor (Uhlenhuth). Untersuchungen über Geschlechtsbestimmung sind von Dunbar bei Tieren und Pflanzen mit Erfolg angestellt worden.

## Präcipitationsverfahren in der Physiologie und klinischen Medizin.

Bei jungen Tieren (Säuglingen) läßt sich oral aufgenommenes Eiweiß im Blut mit Hilfe der Präcipitation nachweisen. Bei älteren Tieren ist dies nur nach Eiweißüberfütterung oder Schädigung der Magenschleimhaut möglich. Zur Erkennung des Echinokokkenbefalles werden Präcipitationsversuche angestellt, die jedoch nach Gräß als gescheitert zu betrachten sind. Gegenüber den Befunden, welche die Möglichkeit eines biologischen Nachweises bösartiger Tumoren durch das Präcipitationsverfahren zu beweisen scheinen, wird man sich äußerst skeptisch verhalten müssen (Uhlenhuth). Für den Nachweis der Verwandtschaftsverhältnisse im Pflanzenreich erwies sich die Präcipitation wegen der Mitreaktion ganz unspezifischer Reserveeiweißstoffe als nicht geeignet.

Auf die Technik der Herstellung präcipitierender Antisera braucht hier nicht eingegangen werden. Uhlenhuth fordert von präcipitierenden Antiseren folgende notwendige Eigenschaften. Das Serum soll

1. vollkommen klar und keimfrei sein, es darf nicht opalisieren,
2. hochwertig sein und
3. artspezifisch sein.

Die Sera werden durch bakteriendichte Filter klar und keimfrei filtriert. Opalisierende Seren sollen zur Untersuchung nicht verwendet werden. Die Wertigkeit wird durch die Titerbestimmung festgestellt. Die Titerbestimmung nach Uhlenhuth und Beumer geschieht in folgender Weise: Serum wird in Verdünnungen von 1 : 1000, 1 : 10 0000 und 1 : 20 000 mit dem homologen Antiserum geprüft. Bei der stärksten Verdünnung muß die beginnende Trübung deutlich nach 5 Minuten erkennbar sein. Sera, die mit heterologen Eiweißlösungen in Verdünnungen über 1:200 Trübungen hervorrufen, sind unbrauchbar.

Außer zur Untersuchung von Fleisch und zubereiteten Fleischwaren eignet sich das biologische Verfahren zur Unterscheidung von Fischfleisch (Uhlenhuth), Schildkrötenfleisch und Froschfleisch (Yoshinaga). Zu erwähnen sind ferner noch die Untersuchung von Teigwaren, Eierkognak, Eiergelbmargarine und Eiweißnährpräparaten auf Eigelb. Kodama untersuchte Verfälschungen von Kaviar mit minderwertigen Fischrogen und v. Sange und Thöni bestimmten auf biologischem Wege den mengenmäßigen Gehalt von Bienenhonig in Honiggemischen.

Döhrmann (1) versuchte mit Hilfe der serologischen Arbeitsverfahren die Rassenbestimmung des ungarischen Mangolica-, des Yorkshire-, Berkshire- und des veredelten deutschen Landschweines. Die Versuche blieben erfolglos, da die Verteilung der einzelnen Blutgruppen der untersuchten Schweinerassen keine wesentliche Unterschiede aufweist. Wenn man die Entstehung der Schweinerassen betrachtet, so wird das negative Ergebnis erklärlich.

Jordanoff (2) stellte fest, daß eine Unterscheidung zwischen der Milch von Kühen, Büffeln, Schafen und Ziegen mit den auf dem üblichen Wege hergestellten Laktoseren nicht möglich ist, weil die Laktoseren unspezifisch sind. Um sie spezifisch zu machen, wurden sie einer allmählichen Absättigung unterworfen, d. h., daß zum Beispiel ein Kuh-Laktoserum zunächst mit Büffelmilch, dann mit Ziegenmilch und schließlich mit Schafmilch zusammengebracht wurde. Nach jeder Reaktion wurde das Serum von dem betreffenden Präcipitat durch Ausschleudern befreit. So waren zum Schluß von den ursprünglich vorhandenen unspezifischen Präcipitinen drei spezifische aus dem Serum entfernt worden, sodaß das Laktoserum, jetzt Laktotest genannt, nur noch mit Kuhmilch, nicht aber mit der Milch der drei anderen Tierarten präcipitieren konnte. In gleicher Weise wurde mit den Laktoseren der Büffel, Schafe und Ziegen verfahren, sodaß er zum Schluß vier spezifische Laktoteste erhielt.

Für die Unterscheidung von Butterarten wurden Laktosera mit aus Butter gewonnener Caseinlösung hergestellt und ihre Arteigenheiten ebenfalls durch Absättigung erreicht. Mit Hilfe dieser arteigenen Seren war die Bestimmung der Butterarten möglich.

Trawinski (8) arbeitete die Präcipitation aus für die Untersuchung von Schlachtschweinen auf Trichinen. Als Antigen wurde eine Aufschwemmung von zerriebenen jungen Trichinen benutzt, die durch künstliche Verdauung von infiziertem Kaninchenfleisch gewonnen wurden. Zur Untersuchung wurde das Blutserum

der Schweine benutzt. Die Präcipitationsreaktion ermöglichte die Feststellung der Trichineneinwanderung im Schweineorganismus vom 12. Ansteckungstag an. Spezifische Präcipitine sind in geringer Menge schon beim Vorhandensein der Darmtrichinen feststellbar; während der Wanderung der Trichinen in den Blutgefäßen steigt ihre Menge, erlangt den Höhepunkt zwischen dem 25. und 40. Ansteckungstag und fällt dann langsam zurück. Noch längere Zeit nach völliger Abkapselung lassen sich im Blutserum spezifische Präcipitine nachweisen.

Rodenbeck (5) stellte Untersuchungen an über die biologische Differenzierung lange gekochten Fleisches und kam zu folgendem Ergebnis: Die bisher bekannten, auf Kocheiweiß reagierenden präcipitierenden Immunsera versagen bei sehr lange gekochtem Fleisch und bei den Hühnerbrühwürfeln des Handels. Mittels eines durch Alkaliwärmebehandlung aus Vollfleisch hergestellten Immunserums ließ sich solches Eiweiß noch nachweisen. Auch war es möglich mit diesem Serum nachzuweisen, daß der unlösliche Rückstand der handelsüblichen Hühnerfleischbrühwürfel Hühnerfleisch enthält. Der präcipitatorisch-biologische Nachweis von Fleischextrakt ließ sich nicht erbringen; er gab zwar mit hochwertigen präcipitierenden Seren mitunter unspezifische Trübungen, wirkte aber nicht im Leben als Antigen.

Trawinski und Rothfeld untersuchten die Möglichkeit der Anwendung der Präcipitationsreaktion zum Nachweis der Gehirncystizerkose beim Menschen und schreiben in der Zusammenfassung: In 4 Fällen, in welchen die klinischen Symptome den Verdacht auf Gehirncystizerkose erweckten, wurde die Präcipitationsreaktion mit spezifischem Antigen angewendet; in allen 4 Fällen war der Befund positiv. In einem von diesen Fällen wurde die Zystizerkose durch die Sektion bestätigt, im zweiten durch das gleichzeitige Vorhandensein von Hautcystizerken sichergestellt, im dritten Fall konnte nur die Wahrscheinlichkeitsdiagnose gestellt werden, während im vierten Fall nur die positive Präcipitationsreaktion den einzigen Hinweis zur Erklärung der epileptischen Fälle bot.

Die Präcipitationsreaktion erwies sich bei der Gehirncystizerkose als spezifisch.

Krassow (3) prüfte die Präcipitationsreaktion zur Erkennung der Virusschweinepest an gesunden, an künstlich angesteckten und an natürlich an Schweinepest erkrankten Schweinen. Als präcipitierendes Serum benutzte er Serum von Kaninchen,

die mit Harn von natürlich erkrankten Schweinen geimpft worden waren. Als Präcipitinogen benutzte er Harn von viruskranken Schweinen. Die Präcipitation trat im Harn künstlich angesteckter Ferkel nach 10—15 Minuten, im Harn natürlich erkrankter Ferkel nach 4—7 Minuten ein. Bei Harn gesunder Schweine zeigte sich kein Präcipitationsring.

# C. Eigene Versuche.

## 1. Fragestellung und Arbeitsweise.

Folgende Fragen waren zu untersuchen:

1. Welches Präcipitationsverfahren liefert bessere Ergebnisse, das Unterschichten nach Uhlenhuth oder Ueberschichten nach Ascoli?
2. Es soll geprüft werden, ob die Kaltauszüge mit physiologischer Kochsalzlösung gegenüber den Kaltauszügen mit Karbolkochsalzlösung Vorteile bieten.
3. Desgleichen sollen Kaltauszüge und Chloroformauszüge miteinander verglichen werden.
4. Besteht ein Unterschied in der Eignung der Auszüge zur Präcipitation, wenn diese bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank aufbewahrt werden?
5. Welche Art der Klärung ist am besten geeignet
   a. die Filtration durch Hartfilter,
   b. die Filtration nach Schütteln mit Tierkohle,
   c. die Filtration durch Kieselgur auf Hartfilter,
   d. oder das Zentrifugieren.
6. Besteht ein Unterschied in der Präcipitation, wenn die Konzentration der Auszüge geändert wird
   a. durch verschiedene Mengen Auszugsflüssigkeit,
   b. durch Verdünnen der Filtrate?
7. Nach welcher Auszugszeit tritt die Reaktion ein?

### Arbeitsweise.

Zur Frage 1. Die Arbeitsmethoden nach Uhlenhuth und Ascoli.

Die für die Uhlenhuth-Reaktion verwendeten Röhrchen sind etwa 50 mm lang und haben einen lichten Durchmesser von 5 mm. Die entsprechenden Maße für die Ascoli-Röhrchen sind 22 mm und 3 mm. Die Röhrchen müssen vollständig klar sein, solche mit Bläschen im Glas oder Brandspuren scheiden aus. Nach gründlicher Reinigung werden die Röhrchen durch Erhitzen keimfrei ge-

macht und vor dem Gebrauch mit einem mit fettfreier Watte umwickelten Stäbchen ausgewischt und auch außen mit Watte abgerieben. Die Pipetten und alle anderen Glassachen sind gereinigt und keimfrei gemacht. In den Röhrchen werden das präcipitierende Serum und der zu untersuchende Fleischauszug zusammengebracht.

Nach dem Verfahren von Uhlenhuth ist im Reichsfleischbeschaugesetz in B. B. D. Anlage a, § 16 die Ausführung der biologischen Untersuchung auf Pferdefleisch vorgeschrieben. 30 g Muskelfleisch werden auf Schreibpapier auf ausgekochter Unterlage geschabt und zusammen mit 50 ccm physiologischer Kochsalzlösung in sterilisiertem 100 ccm Erlenmeyerkolben mit sterilem Glasstab verteilt. Stehen lassen 3 Stunden bei Zimmertemperatur oder über Nacht im Eisschrank, nicht schütteln. 2 ccm der Auszugsflüssigkeit werden in sterilem Reagensglas geschüttelt, es soll ein feinblasiger Schaum entstehen. Der Auszug wird dann filtriert durch gehärtete Papierfilter oder Kieselgur auf Büchner-Trichter oder Berkefeld-Kieselgurkerzen. 1 ccm des Filtrats muß gekocht mit 1 Tropfen Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,153 eine opalisierende Trübung geben, die nach 5 Minuten als feiner flockiger Niederschlag zu Boden sinkt. Dann ist die Eiweißkonzentration etwa 1:300. Wenn sie zu stark ist, muß mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden. Das Filtrat soll neutral, schwach sauer oder schwach alkalisch sein. Mit steriler Pipette gibt man 1 ccm des Filtrats in Röhrchen 1, 1 ccm in Röhrchen 2, 1 ccm Pferdefleischfiltrat in Röhrchen 3, 1 ccm Schweinefleischfiltrat in Röhrchen 4, 1 ccm Rindfleischfiltrat in Röhrchen 5, 1 ccm sterile physiologische Kochsalzlösung in Röhrchen 6. Zu Röhrchen 2 wird 0,1 ccm klares Normal-Kaninchenserum gegeben, zu den übrigen Röhrchen 0,1 ccm vollständig klares Pferde-Antiserum vom Titer 1:20000 so zugesetzt, daß es an der Wand abfließt und sich am Boden sammelt.

Beurteilung: Tritt in Röhrchen 1 und 3 nach 5 Minuten eine hauchartige Trübung auf, die sich nach weiteren 5 Minuten in eine wolkige umwandelt und nach spätestens 30 Minuten als Bodensatz abhebt, während die übrigen Röhrchen klar bleiben, so liegt Pferdefleisch vor.

In gleicher Weise wurden in meinen Untersuchungen die Uhlenhuth-Reaktionen durchgeführt, jedoch wurden die Auszüge einer Fleischart nur gegen homologes Serum geprüft. Das Ueberschichten wurde im einzelnen in folgender Weise vorgenommen:

In das Röhrchen wird eine kleine Menge, höchstens 0,1 ccm, etwa 2–3 Tropfen präcipitierendes Serum mit einer feinen Pipette derart eingebracht, daß das Serum vom oberen inneren Rand des Röhrchens an der Wand herunter auf den Boden fließt. Hierbei wird ein Streifen der Wand von oben bis unten benetzt. Das ist sehr wichtig, denn auf diesem Streifen soll nachher das Filtrat ebenfalls herunterfließen. Es wird mit einer feinen Pipette genau an derselben Stelle wie das Serum eingebracht. Es darf nur ganz langsam an der Wand des Röhrchens herabgleiten, denn nur so kommt eine wirkliche Ueberschichtung zustande. Nimmt man eine andere Stelle des Röhrchens oder ist das Serum schon eingetrocknet, dann ist die Klebekraft zwischen Glas und Flüssigkeit nicht groß genug und der Tropfen fällt als Ganzes in das Serum und vermischt sich mit ihm. Dann kann kein scharfer Ring zustande kommen. Man kann auch, um die Benetzung zu erhöhen, das Röhrchen von oben her anhauchen, sodaß es von innen leicht beschlägt, auch dann gleitet die Flüssigkeit in dünnster Schicht nach unten. Wichtig ist es, das Serum bald nach dem Einfüllen mit dem Filtrat zu überschichten, dann ist ein sicheres und einwandfreies Arbeiten gewährleistet. Die Beobachtung der Röhrchen geschieht bei schräg von vorn und oben auf die Röhrchen fallendem Licht gegen einen schwarzen Hintergrund. Die Röhrchen müssen dabei senkrecht in Augenhöhe in ihrem Gestell hängen.

## Zu den Auszügen im allgemeinen.

Schütz und Pfeiler (6) prüften die Kochauszüge nach Ascoli auf ihre Eignung zur Präcipitation. Sie fanden, daß die Kochauszüge häufig opalisierten und dadurch die Beobachtung der Reaktion erschwerten. Auch gaben die Kochauszüge vereinzelt negative Ergebnisse. Sie arbeiteten ein anderes Auszugsverfahren aus, indem sie ein haselnußgroßes Stück des verdächtigen Materials im Mörser mit etwa 10 g Porzellansand verrieben und mit Chloroform überschichteten. Nach einigen Stunden wurde letzteres abgegossen, der Organbrei durch Umrühren mit einem Glasstab zerkleinert und mit physiologischer Kochsalzlösung überschichtet. Nach zwei Stunden wurde die Flüssigkeit durch ein Papierfilter filtriert. Die Chloroformauszüge zeigten sich den Kochauszügen an Zuverlässigkeit überlegen.

Ein namentlich für die Untersuchung von Milzbrandhäuten ausgezeichnet brauchbares Verfahren der Extraktbereitung, ein

Kaltauszugsverfahren, ist von Müssemeier, Franke, Standfuß und Schnauder ausgearbeitet worden. Hiernach wird die in feine Stücke zerschnittene Hautprobe mit Karbolkochsalzlösung mindestens 4 Stunden im Eisschrank ausgelaugt, dann leicht geschüttelt und scharf zentrifugiert.

Bei meinen Untersuchungen wurde für die Auszüge nur frisches Fleisch von Pferd, Schwein und Rind benutzt. Die Auszüge einer Fleischart wurden nur gegen homologes Antiserum geprüft. Jede der 403 Reaktionen bestand aus einer Schichtprobe entsprechend dem Ascoli-Verfahren, einer Reaktion nach Uhlenhuth und einer Vergleichsprobe mit Normal-Kaninchenserum. Die Sera hatten einen Titer von 1 : 20 000 und stammten vom Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch", Berlin.

Es wurden in jeder der 12 Versuchsreihen – außer in der ersten – 6 Auszüge hergestellt und zwar 2 Kaltauszüge mit physiologischer Kochsalzlösung, 2 Auszüge mit Karbolkochsalzlösung und 2 Chloroformauszüge, im ganzen 69 Auszüge. Von den 6 Auszügen einer Reihe wurden 3 bei Zimmertemperatur und 3 im Eisschrank aufbewahrt. Die 6 Auszüge einer Reihe wurden immer mit der gleichen gewogenen Menge Fleisch und der gleichen Menge ausziehender Flüssigkeit hergestellt. Zur Vereinfachung habe ich die Kaltauszüge mit physiologischer Kochsalzlösung als A-Auszüge, die mit Karbolkochsalzlösung als B-Auszüge und die Chloroformauszüge als C-Auszüge bezeichnet. Die Auszüge der ersten Reihe waren mit den in der amtlichen Vorschrift (Fleischbeschaugesetz B. B. § 16) angegebenen Mengen Fleisch und ausziehender Flüssigkeit angesetzt, die Auszüge der übrigen Reihen jedoch mit verschiedenen, innerhalb einer Reihe aber gleichen, Mengen.

2. Kaltauszug mit physiologischer Kochsalzlösung oder Karbolkochsalzlösung.

Die physiologische Kochsalzlösung ist eine 0,85 % Kochsalz enthaltende Lösung. Die Karbolkochsalzlösung ist eine physiologische Kochsalzlösung mit 10 % einer 5 %igen Karbollösung, sie enthält also 0,5 % Karbolsäure. Die Auszüge wurden in folgender Weise hergestellt: Frisches, fett- und fascienfreies Muskelfleisch wurde auf einem ausgekochten Holzbrettchen fein geschabt, bestimmte Mengen davon abgewogen und in Glaskolben zusammen mit bestimmten Mengen physiologischer Kochsalzlösung bezw. Karbolkochsalzlösung mit einem Glasstab verteilt. Die Kolben wurden

dann eine bestimmte Zeit bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank mit einem Wattebausch verschlossen aufbewahrt.

3. Kaltauszug oder Chloroformauszug?

Der Chloroformauszug wird in folgender Weise hergestellt: Eine abgewogene Menge Fleisch wird im Mörser mit ungefähr der gleichen Menge ausgeglühten sterilen Seesand unter Zusatz von Chloroform fein zerrieben. Es soll soviel Chloroform zugegeben werden, daß dieses noch etwas übersteht. Es dürfen nach dem Zerreiben keine Fleischteilchen mehr erkennbar sein, was nach einer Dauer von etwa 10 Minuten der Fall ist. Das überstehende Chloroform wird dann abgegossen und die Reibschale in den Brutschrank gestellt, bis sämtliches Chloroform verdampft ist. Das dauert ungefähr eine halbe Stunde und ist daran zu erkennen, daß der Inhalt der Schale beim Umrühren keinen Chloroformgeruch mehr hat. Darauf wird dem Inhalt soviel physiologische Kochsalzlösung zugegeben wie dem entsprechenden Kaltauszug. Ebenso wie die beiden Kaltauszüge untereinander, wurden die Chloroformauszüge mit den Kaltauszügen verglichen.

4. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank?

Die Zimmertemperatur schwankte zwischen 17 und 21 ° C., die Temperatur des Eisschrankes zwischen 1,5 und 3 ° C. Zur Entnahme der Auszüge wurden die Kolben kurz aus dem Eisschrank herausgenommen und gleich nachher wieder hereingestellt.

5. Klärung der Auszüge.

S t a n d f u ß (7) schreibt über die Schwierigkeiten der Klärung: Wenn die Auszüge nach der Filtration nicht wasserklar sind – Färbung schadet nicht –, dann gibt es drei Möglichkeiten der Klärung:

1. Zentrifugieren $^1/_2$ bis 2 Stunden bei 3000 Umdrehungen in der Minute. Das Ausschleudern ist die beste Art der Klärung, aber zu umständlich.
2. Filtrieren durch Asbestwolle; das Verfahren ist nicht unbedenklich, schwach positive Reaktionen sind nach der Filtration manchmal negativ.
3. Nach Franke Schütteln mit Tierkohle; das Verfahren ist sehr gut. Zu einer erbsengroßen Menge Tierkohle (Carbo med. Merck) werden 5 – 7 ccm Auszug gegeben, das Ganze kurz geschüttelt und dann sofort filtriert. Die ersten Tropfen sind oft schwarz. Filter, Trichter und Reagensglas müssen bereit stehen. Schon nach 3 – 5 Minuten kann die Kohle alle Präcipitationsstoffe adsorbiert haben. Vom Zusammenbringen

der Kohle mit dem Auszug bis zum Auslaufen aus dem Trichter dürfen höchstens 2 Minuten vergehen. Für die Untersuchung beim Rind ist dies das beste Klärverfahren.

Bei meinen Versuchen wurden für die Klärung mit Hartfilter, Hartfilter Nr. 575 der Fa. Schleicher & Schüll, Düren, von 7 cm Durchmesser benutzt. Die Filter wurden glatt gefaltet und in passenden kleinen Glastrichtern kurz vor Gebrauch gut angefeuchtet. Dann wurden mit der Pipette die Aufzüge auf die Filter gebracht.

Für die Klärung mit Tierkohle wurde Carbo med. Merck verwendet. 100 mg Kohle – eine etwa erbsengroße Menge – wurden in ein Reagensglas gebracht, dazu kommen 2–3 ccm Filtrat und diese wurden 3–4 mal umgeschüttelt. Das Schütteln darf nicht länger als 10 Sekunden dauern. Dann wurde das Gemisch sofort auf ein bereitgestelltes angefeuchtetes Normalfilter geschüttet und filtriert. Wenn die ersten Tropfen schwärzlich waren, wurden sie nochmals auf das Filter gegeben.

Die Zeit vom Zusammenbringen der Flüssigkeit mit der Kohle bis zur Beendigung der Filtration darf 2 Minuten nicht überschreiten.

Für die Klärung mit Kieselgur wurde ausgeglühte Kieselgur verwendet. 300 mg Kieselgur (eine Messerspitze) wurden auf ein angefeuchtetes Hartfilter aufgeschichtet, leicht angedrückt und in der Mitte etwas vertieft. Darauf läßt man 3–4 ccm des zu klärenden Filtrats aus einem Reagensglas ganz ohne Schwung zulaufen und filtrieren. Die Filtration dauert 17–25 Minuten.

Für die Klärung durch Zentrifugieren wurde das zu klärende Filtrat in ein Spitzröhrchen gebracht und gegen ein anderes Röhrchen mit Filtrat oder Wasser genau ausgewogen. Es wurde mit einer Drehzahl von 3000 je Minute verschieden lange Zeiten ausgeschleudert.

6. Aenderung der Konzentration der Auszüge.

Es wurden statt der in der amtlichen Vorschrift angegebenen Mengen Fleisch und ausziehender Flüssigkeit (30 g und 50 ccm) von diesen verschiedene Mengen verwendet und zwar von 10 g Fleisch und 30 ccm Flüssigkeit bis 0,5 g Fleisch und 20 ccm Flüssigkeit (Uebersicht 8). Die zweite Art, die Konzentration der Auszüge herabzusetzen bestand darin, daß die klaren Filtrate mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurden. Das geschah in der Weise, daß zu 0,5 ccm Filtrat für die Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:8, 1:10 und 1:20, die entsprechenden Mengen Kochsalzlösung 0,5, 1,0, 1,5, 2,5, 4,0, 5,0

und 10,0 ccm gegeben wurden. Mit den so verdünnten Filtraten wurden die Versuche durchgeführt.

Zur Frage 7. Nach welcher Auszugszeit tritt die Reaktion ein?

Es wurden zu 17 verschiedenen Zeiten, nach 10, 15, 30, 45 und 50 Minuten, nach 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 6, 7 und 15 Stunden Filtrate hergestellt.

## 2. Untersuchungen und Ergebnisse.

Zur Frage 1. „**Welches Verfahren liefert bessere Ergebnisse, das Unterschichten nach Uhlenhuth oder das Ueberschichten nach Ascoli?**" mußte festgestellt werden, ob die Präcipitation nach den beiden Verfahren zu gleicher Zeit und in gleicher Stärke eintritt. Die Untersuchungen wurden in 403 Einzelreaktionen durchgeführt.

Die Angaben des Eintritts und der Stärke der Reaktion erfolgte durch + Zeichen. 4 Reaktionsstärken wurden angegeben: + = eben wahrnehmbarer, hauchfeiner Ring, ++ etwas deutlicher sichtbar, +++ kräftiger und ++++ sehr kräftiger Ring. Abgelesen wurde die Reaktion bei allen Versuchen nach 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten. Bei dem Uhlenhuth-Verfahren ließen sich deutlich nur 3 Reaktionsstärken unterscheiden. Es tritt auch hier Ringbildung ein, jedoch bleibt der Ring nicht so scharf begrenzt, sondern er lockert sich auf, verbreitet sich und fasert verhältnismäßig schnell auf. Gleichzeitig entsteht im Serum eine hauchartige bis wolkige Trübung, die sich allmählich als Bodensatz absetzt. Das ist auch erklärlich, denn bei dem Vorbeigleiten des spezifisch schwereren Serums an dem leichteren Fleischauszug werden winzige Teilchen des Auszuges mitgerissen und sind dann im Serum aufs Feinste verteilt. Anders dagegen bei dem Ascoli-Verfahren. Hier wird der spezifisch leichtere Auszug auf das Serum geschichtet, sodaß — sorgfältiges Arbeiten vorausgesetzt — die beiden Flüssigkeiten sich nur mit einer Fläche berühren. Die Diffusion der beiden Flüssigkeiten geschieht so langsam, daß das Auftreten einer Trübung an den Grenzflächen als ein scharfer dünner Strich sichtbar wird. Dieser Strich ist zunächst hauchfein, verbreitet sich dann, bleibt aber scharf begrenzt, bis er nach etwa 20 Minuten seine größte Breite erreicht hat. Die scharfe Begrenzung bleibt noch nach 30—40 Minuten bestehen,

dann lockert sich der Ring nach beiden Seiten allmählich auf. Die Beobachtungsdauer wurde deshalb auf 30 Minuten begrenzt.

Wie verhalten sich nun diese beiden Verfahren zueinander. Bei Reaktionen, die im allgemeinen kräftig verlaufen, ist ein wesentlicher Unterschied nicht festzustellen. Die Reaktionen treten bei beiden Verfahren durchweg gleichzeitig ein und nehmen auch gleichmäßig an Stärke zu. Das bleibt so bis zu einer Beobachtungsdauer von 20 Minuten. Zu diesem Zeitpunkt ist die Ringbildung bei dem Ascoli-Verfahren klar und scharf, während bei dem Uhlenhuth-Verfahren sich der Ring jetzt auflockert und zerfasert. Damit ist hier eine weitere Bewertung der Ringbildung und somit ein direkter Vergleich mit dem Ascoli-Verfahren nicht mehr möglich.

Anders sieht es jedoch aus bei Reaktionen, die durch Klärung oder Verdünnung der Auszüge bis an die Grenze der Beobachtungsmöglichkeit getrieben wurden. Hier treten bei Reaktionen, die nach dem Ascoli-Verfahren noch schwach, aber sicher zu beobachten sind, bei dem Uhlenhuth-Verfahren keine sicheren Ergebnisse mehr auf. Das soll nicht heißen, daß sie nicht da sind, sie müssen da sein; aber sie sind wegen ihrer zu geringen Deutlichkeit, wegen einer zu geringen „Dichte" nicht mehr zu sehen.

Die Reaktion des Uhlenhuth-Verfahrens fiel in einigen Fällen negativ aus, während die Ascoli-Reaktion positiv war, und zwar in folgenden Fällen: Infolge Klärung mit Kohle allein in 2 Fällen, durch Klärung mit Kohle und Verdünnung in 3 Fällen, durch Klärung mit Zentrifuge und Verdünnung in 2 Fällen, durch Verdünnung allein in 18 Fällen. Das sind insgesamt 25 Ausfälle = 6,2 % der Gesamtbeobachtungen (Uebersicht 1). Nach der Art der Auszüge geordnet, verteilen sich die Ausfälle auf folgende Auszüge. Die Uhlenhuth-Reaktion blieb aus bei A-Auszügen (Kaltauszüge mit physiologischer Kochsalzlösung) in 6 Fällen, bei B-Auszügen (Kaltauszüge mit Karbolkochsalzlösung) in 11 und bei C-Auszügen (Chloroformauszüge) in 8 Fällen. Bei all diesen Ausfällen war die Stärke der Ascoli-Reaktion gleich 1. Was also die Feinheit der Reaktion anlangt, ist das Ascoli-Verfahren dem Uhlenhuth-Verfahren überlegen. Außerdem ist das Ascoli-Verfahren sparsamer, denn 1 ccm präcipitierendes Serum reicht für 15—17 Ascoli-Reaktionen, während die gleiche Menge nur für 7—8 Uhlenhuth-Reaktionen ausreicht.

## Uebersicht 1.

Beobachtungsschärfe bei den Verfahren nach Ascoli und Uhlenhuth.
Gesamtzahl der Reaktionen 403.
Ausfall der Reaktion bei dem Verfahren nach Uhlenhuth.

| Ausfall der Uhlenhuth-Reaktion | Zahl der Fälle |
|---|---|
| Durch Klärung mit Kohle allein . . . . . | 2 |
| Durch Klärung mit Kohle und Verdünnung . | 3 |
| Durch Klärung mit Zentrifuge und Verdünnung | 2 |
| Durch Verdünnung allein . . . . . . . . . | 18 |
| | Summe 25 = 6,2 % |

### Physiologische Kochsalzlösung oder Karbolkochsalzlösung.

Die Untersuchung der Kaltauszüge mit physiologischer Kochsalzlösung und Karbolkochsalzlösung erstreckte sich auf 3 Fragen:

1. Klarheit der Filtrate,
2. Eintritt der Präcipitation und
3. Stärke der Präcipitation.

Die Fragen mögen an einem Beispiel besprochen werden. Die Kaltauszüge der 1. Versuchsreihe, $A_1$ und $B_1$, waren genau nach amtlicher Vorschrift angesetzt worden. Nach 15 Stunden Aufenthalt im Eisschrank werden sie durch Hartfilter filtriert. Der A-Auszug war hiernach klar, während der B-Auszug trübe filtrierte. Es wurde dann teils mit Kohle, teils mit Kieselgur und teils mit Zentrifuge geklärt. Bei allen B-Filtraten trat die Reaktion genau so schnell ein wie bei dem A-Filtrat. Während nun die Stärke der Reaktion bei dem zentrifugierten B-Filtrat genau so groß war wie bei dem A-Filtrat, nämlich 4, war sie bei den mit Kohle und Kieselgur geklärten Filtraten geringer, 3.

Diese Verhältnisse finden wir in gleichem und ähnlichem Maße bei allen Versuchsreihen wieder. Eintritt und Stärke der Reaktion waren bei zugehörigen Filtraten, die nicht besonders geklärt zu werden brauchten, immer gleich, gleichviel ob die Auszüge nun nach 10 Minuten oder nach mehreren Stunden filtriert wurden. Auch bei den verschiedensten Verdünnungen konnten hier keine Unterschiede festgestellt werden.

Anders ist es jedoch mit der Klarheit der Filtrate. Grundsätzlich wurden alle Auszüge nicht durch Normalfilter, sondern sofort durch Hartfilter geschickt. So wurden in den 12 Versuchsreihen von insgesamt 69 Auszügen (23 A-, 23 B- und 23 C-Auszüge) 179 unverdünnte Filtrate hergestellt und zwar 59

A-Filtrate, 62 B-Filtrate und 58 C-Filtrate (Uebersicht 2). Von den 59 A-Filtraten mußten 14 = 23,7 % geklärt werden; von den 62 B-Filtraten jedoch 31 = 50 % (Uebersicht 3). Von 75 Pferdefleischfiltraten waren 23 A-, 28 B- und 24 C-Filtrate. Von diesen wurden 42 geklärt und zwar 10 A-Filtrate = 43,5 %, 25 B-Filtrate = 89,3 % und 7 C-Filtrate = 29,2 % (Uebersicht 3).

Von 80 Schweinefleisch-Filtraten waren 28 A-, 26 B- und 26 C-Filtrate. Von diesen wurden 8 geklärt und zwar 4 A-Filtrate = 14,28 % und 4 B-Filtrate = 15,39 % (Uebersicht 3).

Von 24 Rindfleisch-Filtraten waren 8 A-Filtrate, 8 B-Filtrate und 8 C-Filtrate. Von diesen wurden 2 geklärt und zwar 2 B-Filtrate = 25 %.

**Uebersicht 2**

Filtrate unverdünnt insgesamt.

| Art der Auszüge | A | B | C | Summe |
|---|---|---|---|---|
| Pferdefleisch . | 23 | 28 | 24 | 75 |
| Schweinefleisch | 28 | 26 | 26 | 80 |
| Rindfleisch . . | 8 | 8 | 8 | 24 |
| Summe | 59 | 62 | 58 | 179 |
| = % | 33,0 | 34,6 | 32,4 | 100,0 |

**Uebersicht 3**

Geklärte Filtrate insgesamt

| | | | | | in % der Uebersicht 2 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Art der Auszüge | A | B | C | Summe | A | B | C | Summe |
| Pferdefleisch . . | 10 | 25 | 7 | 42 | 43,5 | 89,3 | 29,2 | 56,0 |
| Schweinefleisch . . | 4 | 4 | – | 8 | 14,3 | 15,4 | – | 10,0 |
| Rindfleisch . . . | – | 2 | – | 2 | – | 25,0 | – | 8,3 |
| Summe | 14 | 31 | 7 | 52 | 23,7 | 50,0 | 12,1 | 29,0 |

Wann traten nun diese Trübungen ein, nach welcher Auszugszeit mußten die Filtrate geklärt werden? Die Auszüge wurden zu den verschiedensten Zeiten filtriert, von 10 Minuten bis 15 Stunden nach Ansetzen der Auszüge. Im Abschnitt 1 (10 bis 50 Minuten) brauchten keine Filtrate geklärt zu werden, im Abschnitt 2 (1—3 Stunden) wurden von 60 Filtraten 15 geklärt, von diesen waren 6 A-Filtrate und 6 B-Filtrate, das sind je 40 %. Im Abschnitt 3 ($3^1/_2$ bis 7 Stunden) wurden von 62 Filtraten 29 geklärt. Von diesen waren 8 A-Filtrate = 27,6 % und 18 B-Filtrate = 62,1 %. Im Abschnitt 4 (15 Stunden) wurden von 3 Filtraten 1 geklärt, 1 B-Filtrat = 100 % (Uebersicht 4 und 5).

## Uebersicht 4

Zahl der unverdünnten Filtrate nach Auszügen geordnet.

| Abschnitt | 1 | | | | | 2 | | | | | 3 | | | | | 4 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Minuten | | | | | Stunden | | | | | | | | | | | | |
| Art der Auszüge | 10 | 15 | 30 | 45 | 50 | 1 | $1^1/_2$ | 2 | $2^1/_2$ | 3 | $3^1/_2$ | 4 | $4^1/_2$ | 5 | 6 | 7 | 15 | Summe |
| Pferdefleisch . . | — | 6 | 6 | — | — | 6 | — | 6 | 6 | 6 | — | 6 | 6 | — | 6 | 18 | 3 | 75 |
| Schweinefleisch . | 6 | 6 | 12 | 6 | 6 | 18 | — | 6 | — | 6 | — | — | — | 6 | 8 | — | — | 80 |
| Rindfleisch . . | — | — | — | 6 | — | — | 6 | — | — | — | 12 | — | — | — | — | — | — | 24 |
| Summe | 6 | 12 | 18 | 12 | 6 | 24 | 6 | 12 | 6 | 12 | 12 | 6 | 6 | 6 | 14 | 18 | 3 | 179 |
| des Abschnitts | | | | | 54 | | | | | 60 | | | | | | 62 | 3 | |

## Uebersicht 5

Zahl der geklärten unverdünnten Filtrate nach Auszugszeiten geordnet.

| Abschnitt | | 2 | | | | 3 | | | | | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Stunden | | | | | | | | | | |
| Art der Auszüge | 1 | $2^1/_2$ | 3 | $3^1/_2$ | 4 | $4^1/_2$ | 5 | 6 | 7 | 15 | Summe |
| A-Auszüge . . . . . . . . . . . | 2 | 2 | 2 | — | — | — | — | 6 | 2 | — | 14 |
| B-Auszüge . . . . . . . . . . . | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4+6** | 2+1* | 31 |
| C-Auszüge . . . . . . . . . . . | — | 2 | 1+1 | — | — | 1 | — | 2 | — | — | 7 |
| Summe | 4 | 6 | 1+5 | 2 | 2 | 3 | 2 | 12 | 4+8 | 2+1 | 52 |
| des Abschnitts | | | 15 | | | | | | 29 | 1 | |
| % der Gesamtfiltrate des Abschnitts | | | 25 | | | | | | 46,8 | 33,3 | 29,0 |

* zwei- bezw. dreimal geklärte Filtrate ** nur in Verdünnung gebrauchte Filtrate.

Es zeigt sich also, daß die Notwendigkeit der Klärung mit dem Alter der Auszüge zunimmt, daß aber die B-Filtrate in steigendem Maße daran beteiligt sind. Die Tatsache, daß 50 % von allen B-Filtraten gegenüber 23,7 % der A-Filtrate geklärt werden mußten, spricht gegen die B-Auszüge. Dazu kommt noch, daß die B-Auszüge viel langsamer filtrieren als die A-Auszüge. Bei einer Auszugsdauer bis zu einer Stunde ist der Unterschied sehr gering, wird dann aber merklich größer und ist bei 4 Stunden Auszugsdauer etwa doppelt so groß. So brauchten in Reihe 2, Auszugs-Nr. 2 und 3, die A- und C-Auszüge (je 2 ccm) 15 Minuten zum Filtrieren, während die B-Auszüge 28 Minuten benötigten (4 Stunden Auszugsdauer).

### Kaltauszug oder Chloroformauszug?

Die Chloroformauszüge wurden mit den Kaltauszügen verglichen in Bezug auf Klarheit der Filtrate, Eintritt und Stärke der Präcipitation. Der Eintritt der Reaktion wies im Vergleich zu den Kaltauszügen keinen wesentlichen Unterschied auf, abgesehen von den Fällen natürlich, in denen die C-Filtrate allein reagierten. Dagegen weist die Stärke der Reaktion einige Besonderheiten auf. Von insgesamt 403 Reaktionen waren die C-Auszüge in 2 Fällen schwächer als die Kaltauszüge (0,49 %). In 14 Fällen (3,47 %) reagierten die C-Auszüge stärker als die Kaltauszüge, und zwar 6 mal in der Verdünnung 1 : 5, 6 mal in der Verdünnung 1 : 10; einmal nach Klärung mit Kieselgur und einmal nach Klärung mit Kohle. Es sind hier natürlich nur gleichwertige Auszüge verglichen worden und nicht solche Reihen, in denen einzelne Filtrate geklärt werden mußten.

Wie steht es nun mit der Klarheit der Filtrate bei den Chloroformauszügen. Von den insgesamt 179 Filtraten waren 58 C-Filtrate. Von diesen 58 Filtraten mußten 7 geklärt werden, das sind 12,1 %. Das ist gegenüber 23,7 % bei den A-Filtraten und 50 % bei den B-Filtraten eine deutliche Ueberlegenheit. (Uebersicht 2 und 3).

Diese Ueberlegenheit der Chloroformauszüge gerade in Bezug auf Klarheit der Filtrate ist wohl in erster Linie darauf zurückzuführen, daß das Chloroform sämtliches Fett löst, das dann mit dem Abgießen des Chlorofo ms entfernt wird. Das störungsfreiere Arbeiten mit den Chloroformauszügen wiegt jedenfalls die Mehrarbeit bei der Herstellung der Auszüge bei weitem auf.

Aufbewahrung der Auszüge bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank.

In den Versuchsreihen, in denen keine Auszüge geklärt wurden, ist weder in den unverdünnten noch in den verdünnten Filtraten ein Unterschied im Eintritt und in der Stärke der Reaktionen zu bemerken, gleichviel ob sie bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank aufbewahrt wurden. Auch in der Klarheit der Filtrate ist in dieser Hinsicht kein bemerkenswerter Unterschied festzustellen, denn von 52 geklärten Filtraten stammten 27, = 52 %, von Auszügen die bei Zimmertemperatur, und 25, = 48 %, von Auszügen die im Eisschrank aufbewahrt wurden. Von den 14 geklärten A-Filtraten waren je 7 von Auszügen, die bei Zimmertemperatur bezw. im Eisschrank, von den 31 B-Filtraten 17 bezw. 14, und von den 7 C-Filtraten 3 bezw. 4, aufbewahrt wurden. Es ist also ohne wesentliche Bedeutung, ob man die Auszüge bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank stehen läßt.

## Klärung der Auszüge.

Es sollte geprüft werden, auf welche Art die Filtrate, die nicht vollständig klar waren, einfach und zuverlässig geklärt werden konnten. 4 Klärverfahren kamen zur Anwendung und zwar:

a. die Klärung durch Filtration durch Hartfilter;

b. die Klärung durch Schütteln mit Tierkohle und anschließender Filtration durch Normal-Papierfilter;

c. Klärung durch Filtration durch auf Hartfilter geschichtetes Kieselgur und

d. Klärung durch Ausschleudern in der Zentrifuge.

a. Klärung durch Hartfilter.

Die Dauer der Filtration nimmt mit dem Alter der Auszüge zu und damit auch mit der Konzentration der Auszüge. 2 ccm Auszug brauchen nach einer Auszugszeit von 10 Minuten etwa 3 Minuten, nach 30 Minuten etwa 5 Minuten, nach $1^1/_2$ Stunden etwa 10 Minuten und nach 4 und mehr Stunden 15 bis 20 Minuten zum Durchlaufen. Dies gilt für die A- und C-Auszüge. Die B-Auszüge filtrieren nach kurzen Auszugszeiten (bis 1 Stunde) ungefähr genau so schnell, nach längeren jedoch langsamer. Nach 4 Stunden brauchen sie etwa die doppelte (28 Minuten) und nach 7 Stunden die 2 bis 3fache Zeit. (Reihe 11, A- und C-Auszüge 17 Minuten, B-Auszüge ungefähr 45 Minuten).

Es wurden grundsätzlich alle Auszüge durch Hartfilter filtriert, da die Normalfilter den Ansprüchen auf ein vollständiges klares Filtrat nicht gerecht werden. Von 69 Auszügen wurden 179 unverdünnte Filtrate hergestellt (Uebersicht 2).

Von diesen 179 Filtraten waren 127 nach der Filtration durch Hartfilter vollständig klar, während 52 Filtrate, = 29 %, einer Nachklärung durch Kohle, Kieselgur oder Ausschleudern unterworfen werden mußten. Nach Auszugszeiten geordnet sah das Bild folgendermaßen aus: Im Abschnitt 1 (10 bis 50 Minuten Auszugsdauer) waren alle Filtrate vollständig klar (Uebersicht 4). Im Abschnitt 2 (1—3 Stunden) mußten von 60 Filtraten 15, = 25 %, nachgeklärt werden, im Abschnitt 3 ($3^1/_2$ bis 7 Stunden) von 62 Filtraten 29, = 46,8 % und im Abschnitt 4 (15 Stunden) von 3 Filtraten 1, = 33,3 %. Bei kurzen Auszugszeiten genügt also die Klärung durch einfache Filtration durch Hartfilter, während nach längeren Auszugszeiten in steigendem Maße eine nachträgliche Klärung der Filtrate mit anderen Mitteln erforderlich ist. Denn wenn ein Hartfilter-Filtrat trübe ist, dann wird es nicht dadurch klarer, daß man es durch ein zweites Hartfilter schickt.

b. 16 Filtrate wurden mit Kohle geklärt. Nach der Klärung waren alle Filtrate vollständig klar. Das Reaktionsvermögen hatte aber bei längerer Dauer der Klärung mehr oder weniger abgenommen, war teilweise sogar ganz erloschen. Die Reaktionsstärke der mit Kohle geklärten Filtrate war in 7 Fällen = 4 43,7 %), in 2 Fällen = 3 (12,5 %), in 2 Fällen = 1 (12,5 %) und in 5 Fällen = 0 (31,3 %). (Uebersicht 6).

In den 5 Fällen, in denen die Filtrate nicht mehr reagierten, waren 4 Filtrate 20 und 25 Sekunden mit Kohle geschüttelt worden, während 1 Filtrat bereits mit Kieselgur vorgeklärt worden war. In den anderen Fällen wurden die Filtrate nur 7 bis 10 Sekunden mit Kohle geschüttelt. Die Kohle adsorbiert also die in dem Filtrat enthaltene präcipitierende Substanz teilweise oder ganz, umso mehr, je länger die Kohle mit dem Filtrat in Berührung bleibt. Es ist also wichtig, daß vor dem Schütteln mit Kohle die angefeuchteten Filter bereitstehen, damit keinerlei Verzögerung in der Arbeit eintreten kann. Die ganze Klärung eines Filtrats, vom Augenblick der ersten Berührung mit der Kohle bis zum Vorhandensein einer ausreichenden Menge klaren Filtrats, kann und soll in 2 Minuten beendet sein. Bei einer solchen Arbeitsweise sind Ausfälle mit Sicherheit zu vermeiden.

c. Von den 52 geklärten Filtraten wurden 14 mit Kieselgur geklärt. Bis auf 1 Filtrat, das im Filter hängen blieb, weil dieses nicht angefeuchtet war und 1 Filtrat, das mit Kohle nachgeklärt werden mußte, waren alle Filtrate nach der Klärung voll-

ständig klar (92,3 %). Von 13 Filtraten reagierten 5 in Stärke 4 (38,5 %), 4 Filtrate in Stärke 3 (30,7 %), 1 Filtrat in Stärke 2 (7,7 %), 1 Filtrat in Stärke 1 (7,7 %) und 2 Filtrate reagierten nicht mehr (15,4 %). Die ganze Klärung dauerte etwa 30 bis 35 Minuten (Uebersicht 6).

## Uebersicht 6

Reaktionsstärke der geklärten Filtrate.

| Reaktionsstärke | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | Summe |
|---|---|---|---|---|---|---|
| geklärt mit Kohle . . | 7 | 2 | – | 2 | 5 | 16 |
| Kieselgur . | 5 | 4 | 1 | 1 | 2+1* | 13+1 |
| Zentrifuge | 21 | 1 | – | – | – | 22 |
| Summe | 33 | 7 | 1 | 3 | 7+1 | 51+1 |

* Filtrat blieb im Filter hängen.

Reaktionsstärke in % der geklärten Filtrate.

| Reaktionsstärke | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| geklärt mit Kohle . . | 43,7 | 12,5 | – | 12,5 | 31,3 | = 100 |
| Kieselgur . | 38,5 | 30,7 | 7,7 | 7,7 | 15,4 | = 100 |
| Zentrifuge | 95,45 | 4,55 | – | – | – | = 100 |
| | 64,8 | 13,7 | 1,96 | 5,84 | 13,7 | = 100 |

d. Durch Ausschleudern mit der Zentrifuge wurden insgesamt 22 Filtrate geklärt. Von diesen 22 Filtraten wurden 19, = 86,4 %, vollständig klar, während 3, = 13,6 %, nicht vollständig klar wurden; ihre Klarheit reichte jedoch zur Ausführung der Präcipitation aus. 2 von diesen 3 Filtraten waren nur 10 bezw. 15 Minuten ausgeschleudert worden und stammten von Auszügen, die 15 bezw. $4^1/_2$ Stunden gezogen hatten. Das dritte Filtrat war 25 Minuten geschleudert, der Auszug 7 Stunden alt. (Uebersicht 7).

**Uebersicht 7**

Klarheit der zentrifugierten Filtrate, geordnet nach der Zeit des Ausschleuderns bei 3000 U Min.

| Zeit Minuten | 10 | 15 | 20 | 25 | 45 | 60 | Summe |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Absolut klar . . | – | – | 8 | 7 | 2 | 2 | 19 = 86,4 % |
| Nicht absolut klar | 1 | 1 | – | 1 | – | – | 3 = 13,6 % |
| Summe | 1 | 1 | 8 | 8 | 2 | 2 | 22 |

Die vollständig klar zentrifugierten Filtrate stammten alle von 6—7 Stunden alten Auszügen. Das Präcipitationsvermögen der geschleuderten Filtrate blieb im vollen Umfang bestehen. 21 Filtrate hatten die Reaktionsstärke 4 (95,45 %), während 1 Filtrat die Stärke 3 aufwies; in diesem Falle reagierten aber alle Auszüge dieser Reihe nur mit Stärke 3, sodaß also auch hier keine Herabsetzung des Präcipitationsvermögens eingetreten war. In dieser Hinsicht ist also die Klärung durch Ausschleudern den anderen Verfahren überlegen und deshalb in allen Fällen, in denen nur geringe Mengen Filtrat zur Verfügung stehen, zu bevorzugen. Ein Nachteil liegt in der Umständlichkeit, denn man wird, um Mißerfolge zu vermeiden, nicht unter 30 Minuten ausschleudern müssen; die ganze Klärung nimmt dann etwa 35 Minuten in Anspruch.

## Änderung der Konzentration der Auszüge.

Es sollte geprüft werden, in welcher Konzentration die Auszüge am besten reagierten und bis zu welcher Verdünnung die Filtrate noch eine beobachtungsfähige Reaktion lieferten. Auf zwei Arten wurde die Aenderung der Konzentration erreicht,

a. durch verschiedene Mengen Auszugsflüssigkeit und

b. durch Verdünnung der Filtrate mit physiologischer Kochsalzlösung.

Die Mengen, mit denen die Auszüge angesetzt wurden, fielen von 30 g Fleisch und 50 ccm Auszugsflüssigkeit bis auf 0,5 g Fleisch und 20 ccm Flüssigkeit (Uebersicht 8). Wenn man das Fleischgewicht in Prozent der Flüssigkeit ausdrückt, so reichen die Sätze für diese Zahlen von 60 % bis 2,5 % (Uebersicht 8). Die unverdünnten Filtrate aller dieser Auszüge reagierten zum weitaus größten Teil in Stärke 4. Wo die Reaktionsstärke geringer war, waren teils Klärungen (Uebersicht 9), teils kurze Auszugszeiten (Uebersicht 11) die Ursache hierzu.

## Ueberſicht 8

Verhältnis des Fleiſchgewichtes zur Menge der Auszugsflüſſigkeit in den einzelnen Verſuchsreihen.

| Verſuchsreihe | Fleiſch g | Auszugsflüſſigkeit ccm | Fleiſchgewicht in % der Auszugsflüſſigkeit |
|---|---|---|---|
| 1 | 30 | 50 | 60,0 |
| 2/3 | 10 | 30 | 33,3 |
| 4/5 | 5 | 20 | 25,0 |
| 6/7 | 5 | 20 | 25,0 |
| 8/9 | 1 | 10 | 10,0 |
| 10/11 | 3 | 20 | 15,0 |
| 12/13 | 1 | 20 | 5,0 |
| 14/15 | 5 | 20 | 25,0 |
| 16/17 | 1 | 20 | 5,0 |
| 18/19 | 5 | 30 | 16,7 |
| 20/21 | 5 | 30 | 16,7 |
| 22/23 | 0,5 | 20 | 2,5 |

## Ueberſicht 9

Reaktionsſtärke der unverdünnten Filtrate.

Die Prozentſätze der Ueberſicht 8 ſind in drei Gruppen zuſammengefaßt worden. Angabe der Zahl für die Reaktionsſtärke 4-0.

| Gruppe | 1 | 2 | 3 | | Davon geklärt mit | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Reaktionsſtärke | 60,0-33,3 % | 25,0-10,0 % | 5,0-2,5 % | Summe | Kohle | Kieſelgur | Zentrifuge | Summe | % |
| 4 | 12 | 85 | 42 | 139 | 7 | 5 | 21 | 33 | 23,7 |
| 3 | 3 | 2 | 19 | 24 | 2 | 3 | – | 5 | 20,8 |
| 2 | – | 1 | 5 | 6 | – | 1 | – | 1 | 16,7 |
| 1 | – | 2 | – | 2 | 1 | 1 | – | 2 | 100,0 |
| 0 | 1 | 7 | – | 7 | 5 | 2 | – | 7 | 100,0 |
| Summe | 16 | 97 | 66 | 178 | 15 | 12 | 21 | 48* | |
| Stärke 4 = % | 75 | 88 | 64 | 78 | | | | | |

* Hier fehlen drei Filtrate, die nur in Verdünnung gebraucht wurden und eins, das im Filter hängen blieb.

Verdünnungen der Filtrate wurde in einem Verhältnis von 1 : 1 bis 1 : 20 hergestellt. Da nun aber die Auszüge verschieden stark angesetzt wurden, würde es ein falsches Bild geben, wenn man die Verdünnung ihrer Filtrate einfach unter sich und miteinander in ihrer Reaktionsstärke vergleichen würde. Deshalb wurden auch die Verdünnungen für die zugehörigen Auszüge als Verhältnis des Fleischgewichtes zur Menge der Auszugsflüssigkeit in Prozent ausgedrückt. Die erhaltenen Prozentsätze sind in vier Gruppen zusammengefaßt, deren höchste Zahlen immer etwa das Doppelte der niedrigsten sind. Die erhaltenen Sätze sind:

| | |
|---|---|
| Gruppe 1 | 12,5 – 6,2 % |
| Gruppe 2 | 5,0 – 2,3 % |
| Gruppe 3 | 1,7 – 0,83 % |
| Gruppe 4 | 0,45 – 0,23 % |

Der Abfall der Reaktionsstärke in den 4 Gruppen ist aus Uebersicht 10 zu ersehen. Beträgt in Gruppe 1 der Prozentsatz der in Stärke 4 reagierenden Filtrate noch 77 %, so fällt er in den folgenden Gruppen auf 50, 10,8 und schließlich 5,5 %. Man sieht aber im 2. Teil der Uebersicht, daß an der Abnahme der Reaktionsstärke in gewissem Maße, jedoch keineswegs ausschlaggebend, die Klärungen beteiligt sind.

## Uebersicht 10

Reaktionsstärke der verdünnten Filtrate.

Die Verdünnungen 1:1 bis 1:20 sind für die zugehörigen Auszüge als Verhältnis des Fleischgewichtes zur Menge der Auszugsflüssigkeit in % ausgedrückt worden. Angabe der Zahl für die Reaktionsstärke 4—0.

| Gruppe | 1 | 2 | 3 | 4 | | Davon geklärt mit | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Reaktionsstärke | 12,5-6,2 % | 5,0-2,3 % | 1,7-0,83 % | 0,45-0,23 % | Summe | Kohle | Kieselgur | Zentrifuge | Summe | % |
| 4 | 23 | 42 | 8 | 2 | 75 | 2 | 1 | 10 | 13 | 17,4 |
| 3 | 5 | 25 | 25 | 2 | 57 | 3 | 4 | 16 | 23 | 40,5 |
| 2 | 2 | 3 | 30 | 14 | 49 | 3 | 1 | 4 | 8 | 16,3 |
| 1 | – | 8 | 8 | 14 | 30 | 6 | – | 4 | 10 | 33,3 |
| 0 | – | 6 | 3 | 4 | 13 | 5 | – | – | 5 | 38,5 |
| Summe | 30 | 84 | 74 | 36 | 224 | 19 | 6 | 34 | 59 | – |
| Stärke 4=% | 77 | 50 | 10,8 | 5,5 | 83,5 | | | | | |

7. Nach welcher Auszugszeit tritt die Reaktion ein?

Um Eintritt und Stärke der Reaktionen nach verschiedenen Auszugszeiten zu ermitteln, wurden in den 12 Versuchsreihen zu 17 verschiedenen Zeiten Filtrate hergestellt. Diese Zeiten reichen von 10 Minuten bis 15 Stunden. In 4 Abschnitten zusammengefaßt, ergeben sich folgende Zahlen:

Im Abschnitt 1 (10 Minuten bis 50 Minuten) wurden 54,
im Abschnitt 2 (1 bis 3 Stunden) 61,
im Abschnitt 3 ($3^1/_2$ bis 7 Stunden) 66 und
im Abschnitt 4 (15 Stunden) 5 Filtrate

hergestellt. Die Zahl der Filtrate mit Reaktionsstärke 4 steigt vom Abschnitt 1 (56 %) über 2 (80 %) bis zum Abschnitt 3 (86 %), um dann im Abschnitt 4 auf 60 % zu fallen (Uebersicht 11). Dieser Abfall ist jedoch lediglich eine Folge der Klärung mit Kohle und Kieselgur. Die Reaktionsstärken 2 und 3 treten am häufigsten im Abschnitt 1 auf und sind nicht durch Klärung verursacht. Die Klarheit der Filtrate sinkt mit der Zunahme der Auszugszeit, denn im Abschnitt 1 wurde kein Filtrat geklärt, im Abschnitt 2 wurden von 61 Filtraten 16 = 26 %, geklärt, im Abschnitt 3 von 66 Filtraten 33 = 50 %, und im Abschnitt 4 von 5 Filtraten 3 = 60 %.

## Uebersicht 11

Zeiten der Filtration nach Ansetzen der Auszüge, zusammengefaßt in 4 Abschnitte. Angabe der Zahl der Reaktionsstärke 4 – 0.

| Abschnitt | 1 Min. | 2 Std. | 3 Std. | 4 Std. | | Davon geklärt mit | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Reaktionsstärke | 10 – 50 | 1 – 3 | 3 1/2 – 7 | 15 | Summe | Kohle | Kieselgur | Zentrifuge | Summe | % |
| 4 | 30 | 49 | 57 | 3 | 139 | 7 | 5 | 21 | 33 | 23,7 |
| 3 | 19 | 2 | 7 | 2 | 30 | 2 | 4 | 1 | 7 | 23,3 |
| 2 | 5 | 1 | – | – | 6 | – | 1 | – | 1 | 16,7 |
| 1 | – | 2 | 1 | – | 3 | 2 | 1 | – | 3 | 100,0 |
| 0 | – | 7 | 1 | – | 8 | 5 | 3 | – | 8 | 100,0 |
| Summe | 54 | 61 | 66 | 5 | 186* | 16 | 14 | 22 | 52 | – |
| Stärke 4 = % | 56 | 80 | 86 | 60 | | | | | | |

| geklärt mit | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Kohle | – | 8 | 7 | 1 | 16 |
| Kieselgur | – | 8 | 5 | 1 | 14 |
| Zentrifuge | – | – | 21 | 1 | 22 |
| Summe | – | 16 | 33 | 3 | 52 |
| = % | – | 26 | 50 | 60 | – |

* Hierbei sind 6 Filtrate eines Auszuges, der nur in Verdünnung verarbeitet wurde und 1 Filtrat, das im Filter hängen blieb.

## D. Zusammenfassung.

1. Das Ueberschichten in Anlehnung an das Verfahren nach Ascoli ist dem Unterschichten nach Uhlenhuth überlegen. Bei 403 Reaktionen versagte die Uhlenhuth-Reaktion in 25 Fällen, das sind 6,2 % der Fälle.
2. Die Kaltauszüge mit physiologischer Kochsalzlösung sind den Kaltauszügen mit Karbolkochsalzlösung vorzuziehen. Im Eintritt und in der Stärke der Präcipitation besteht bei beiden Auszugsarten kein Unterschied. Jedoch waren an den Auszügen, bei denen eine Klärung notwendig wurde, die Auszüge mit physiologischer Kochsalzlösung mit 23,7 %, die Auszüge mit Karbolkochsalzlösung mit 50 % beteiligt.
3. Die Chloroformauszüge lieferten bessere Ergebnisse als die Kaltauszüge. Der Eintritt der Reaktion war der gleiche wie bei den Kaltauszügen. Die Stärke der Reaktion aber war in 3,47 % der Fälle größer als bei den Kaltauszügen. Vor allem aber waren die Chloroformauszüge an den notwendig werdenden Klärungen nur mit 12,1 % beteiligt.
4. Es ist ohne wesentliche Bedeutung, ob die Auszüge bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank aufbewahrt werden.
5. Die durch Filtration durch Hartfilter erzielte Klarheit der Filtrate genügt in vollem Maße bis zu einer Auszugszeit von 50 Minuten. Bei längeren Auszugszeiten ergibt sich in steigendem Maße die Notwendigkeit einer Klärung. Die drei Verfahren, nach denen geklärt wurde, bieten keine besondere Schwierigkeiten. Die Klärung mit Kohle ist zwar am empfindlichsten. Diesem Umstande kann aber durch schnelles Arbeiten in ausreichendem Maße Rechnung getragen werden.
6. Die Auszüge wurden mit verschiedenen Mengen Fleisch und Auszugsflüssigkeit hergestellt. Drückt man das Verhältnis zwischen Fleischgewicht und Flüssigkeitsmenge in Prozent aus, so reichen die Sätze hierfür von 60 % bis 2,5 %. Die unverdünnten Filtrate dieser Auszüge präcipitierten in befriedigender Weise. Schwache Reaktionen und Ausfälle waren durch Klärung verursacht. Drückt man auch die Verdünnungen für die zugehörigen Auszüge als Verhältnis des Fleischgewichtes zur Flüssigkeitsmenge in Prozenten aus, so reichen die Sätze hierfür von 12,5 % bis 0,23 %. Mit dem Abfall des Dichtigkeitsverhältnisses ging ein deutlicher Ab-

fall in der Stärke des Schichtungsringes einher. Unterhalb des Verhältnisses von 5 % ist die Reaktionsstärke nicht mehr befriedigend.

7. Filtrate, welche von Auszügen mit einer Auszugsdauer bis zu 50 Minuten stammen, haben kein voll befriedigendes Präcipitationsvermögen. Nach einer Auszugsdauer von 1 – 3 und von 3 – 7 Stunden ist die Reaktion etwa gleich stark. Da die Filtrate im 2. Falle zu 26 %, im 3. aber zu 50 % geklärt werden mußten, ist eine Auszugsdauer von 1 – 3 Stunden am vorteilhaftesten. Aus demselben Grunde sind Auszugszeiten über 7 Stunden unzweckmäßig.

---

Am Schlusse meiner Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. Standfuß für die Ueberlassung des Themas und seine Unterstützung mit Rat und Tat. Desgleichen danke ich Herrn Schlachthofdirektor Dr. Rolle, Oberhausen, der mir freundlicherweise das Schlachthoflaboratorium zu meinen Versuchen zur Verfügung stellte, und Herrn Stadttierarzt Dr. Thiele für seine Unterstützung in technischen Fragen.

# Schrifttumsnachweis.


1. Döhrmann, A. Sind die Methoden der Isohämagglutination und der Präcipitation zur Ermittelung der Rassereinheit der Schweine anwendbar. Diss. Budapest 1930. ungar. Ref. Berl. tierärztl. Wschr. 42. 1931.
2. Jordanoff, M. Die Differenzierung der verschiedenen Butterarten auf biologischem Wege. Ztschr. f. Fleisch und Milchhyg. 300, 1932.
3. Krassow, W. M. Anwendung der Präcipitationsreaktion zur Diagnostik der Virusschweinepest. Arch. f. Thkde. 70. 237 ff. Ref. Tierärztl. Rsch. 42, 533, 1936.
4. Kraus, Milzbrand. Handb. d. path. Mikroorg. Kolle, Kraus, Uhlenhuth. III. 2. 1112. 1930.
5. Rodenbeck, H. Ueber die biologische Differenzierung lange gekochten Fleisches. Z. Im. Forsch. 72, 482, 1931. Ref. Ztsch. f. Fleisch u. Milchhyg. 282, 1932.
6. Schütz und Pfeiler. Der Nachweis des Milzbrandes mittels der Präcipitationsmethode. Arch. f. Thkde. 38, H. 4, 325 ff. 1912.
7. Standfuß, R. und G. Pohl. Beitrag zur bakteriologischen Milzbrandfeststellung. Arch. f. Thkde. 62. 2. 188.
8. Trawinski, A. Neue Diagnosemethode der Trichinose. Ztsch. f. Fleisch und Milchhyg. 166 ff. 1935.
9. Trawinski, A. und J. Rothfeld. Ueber die Anwendung der Präcipitationsreaktion zum Nachweis der Gehirncystizerkose beim Menschen. Zbl. f. Bakt. I. O., 134. 1935. Ref. Ztschr. f. Fleisch und Milchhyg. 31, 1935.
10. Uhlenhuth, P. und W. Seiffert. Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels der Präcipitation mit besonderer Berücksichtigung der Technik. Handb. d. path. Mikroorg. Kolle, Kraus, Uhlenhuth. III. 1, 365 ff., 1930.

## Lebenslauf.

Ich, Josef Hollands, wurde am 16. 2. 1910 zu Reeserward (Rhld.) als Sohn des Bauern Heinrich Hollands und seiner Frau Hedwig, geb. Köster, geboren. Ich besuchte fünf Jahre die Volksschule in Grietherbusch, 6 Jahre das Progymnasium zu Rees und 3 Jahre das Realgymnasium zu Bocholt, wo ich am 11. 3. 1930 die Reifeprüfung bestand. Anschließend arbeitete ich 6 Monate als Praktikant in einer Maschinenfabrik als Vorbereitung zum Studium des Maschinenbaues, dem ich in Aachen ein Jahr oblag. Dann studierte ich 9 Semester Veterinärmedizin in Gießen, München und Hannover. Am 8. Juni 1936 bestand ich in Gießen die tierärztliche Fachprüfung. Nach der Fachprüfung arbeitete ich 3 Monate als Praktikant am Schlachthof in Oberhausen (Rhld.)